

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-38100

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

C 07 K 15/06  
A 61 K 37/02

識別記号

ABF  
ABL  
ABW  
ADA  
ADT  
ADU

庁内整理番号

8318-4H

④ 公開 昭和64年(1989)2月8日

C 12 P 21/00  
//C 12 P 21/00  
C 12 R 1:91

8615-4C  
H-6712-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

③ 発明の名称 血管内皮細胞増殖因子

② 特 願 昭62-193303

② 出 願 昭62(1987)7月31日

⑦ 発 明 者 内 海 潤 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内  
⑧ 発 明 者 梶 谷 正 行 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内  
⑨ 発 明 者 清 水 洋 彦 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内  
⑩ 出 願 人 東 レ 株 式 会 社 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

#### 明 細 書

#### 1. 発明の名称

血管内皮細胞増殖因子

#### 2. 特許請求の範囲

(1). 下記の性状を有する血管内皮細胞増殖因子タンパク質。

a) 非還元条件下の分子量は38,000～

48,000

b) 還元処理により失活する

c) 等電点は8.5～9.0

#### 3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、医薬あるいは診断薬として、さらには血管内皮研究上有用である新規な血管内皮細胞増殖因子に関する。

[従来の技術]

近年、日本人の死亡率の上位を占める、脳卒中、心臓病の主原因は血管の老化、損傷、機能低下と考えられている。血管内皮細胞は血管の内腔を覆う単層を形成する細胞であり、血管の老化や損傷

を引き起こす動脈硬化の原因である脂質代謝にも関与していることが推察されている。また、悪性腫瘍の増殖は血管新生と密接に関連しており、血管内皮細胞の増殖が必須条件である。さらには、やけどや創傷の治療にも血管新生が必要であり、血管内皮細胞増殖因子の関与が明らかである。

以上のように、本来生体に存在していると思われる血管内皮細胞増殖因子(Endothelial cell growth factor, 以下ECGFと略す)を単離そしてその利用ができれば、動脈硬化に伴う血管内皮の保護薬および治療薬、またやけどや創傷などの治療促進薬となり得ることが期待できる。さらに、ECGFの抵抗薬は血管新生を阻害すると考えられることから、ECGFは、抗悪性腫瘍および慢性関節リウマチや網膜症の治療薬開発のための極めて有用な材料となり得ることが期待できる。加えて、動脈硬化や悪性腫瘍増殖などに起因して血管内皮の増殖が起こり、血中、尿、便などに通常の生理的濃度以上のECGFが存在しているとすれば(種々の疾病で特異的ホルモンの上昇はし

ばしば観察される)、ECGFに対する抗体を作成して、その抗体による前述の疾病の診断薬の開発が可能となる。このように、ECGFの医療上における存在価値は極めて大きく、ちなみに、悪性腫瘍、脳卒中、心臓病が、日本人の死亡率の上位3位までを占めていること(昭和61年度)から考えても、ECGFの医療への利用、応用の有用性は明らかである。

今まで述べてきた背景と期待から、ECGFの探索は近年、精力的に行われてきており、たとえばヒトの脳、軟骨、肝ガン細胞などから分子量18,000~19,000、等電点約5あるいは約10のタンパク質[Lobbら, Anal. Biochem., 154, 1, (1986)]が見出されている。また最近、血小板由来のECGFも見出されており、分子量45,000、等電点4.6[Miyazonoら, J. Biol. Chem., 262, 4098, (1987)]と報告されている。

#### [発明が解決しようとする問題点]

生体物質を抽出して利用する場合、その生産性

質を産生させる能力を有するものであればいかなるものでも良いが、好ましくは、ヒト二倍体線維芽細胞が挙げられる。ヒト二倍体線維芽細胞は正常組織由来で安全性が高く、また種々の大量培養系で長期培養(約50世代数)が可能であり、生産性も高い。さらに、ヒト二倍体線維芽細胞は結合組織、肺など種々の血管に富む組織に存在しており、それゆえ本ECGFは実際に生体内で局所的に血管新生や血管内皮細胞代謝に関与している可能性が高い。

本発明のECGFは次のような方法で得ることができる。本ECGFは、好ましくはヒト線維芽細胞の培養上清あるいは該細胞抽出物に含まれる。ヒト線維芽細胞は通常、5%牛胎児血清を含むイーグルMEM培地で37℃で培養するが、培養上清を精製材料にする場合には、細胞が十分に増殖した後、無血清培地に換える方が望ましい。本ECGFを含む培養上清あるいは該細胞抽出物は、必要に応じて限外濾過や硫酸塩析などで濃縮された後、種々のクロマトグラフィーにかけられ、こ

や安全性が優れている材料や手法を用いることが重要である。ECGFの応用をこの点から考えれば、脳やガン細胞はやや問題があり、また血小板も大量入手は定常的には難しいと思われる。加えて、現在までにECGFは種々の分子種が見付かっており、実際の医療への応用にはどの分子種が適しているのか、あるいは他の組織由来の未発見のECGFの応用の可能性、などが今後の検討課題として残っている。

本発明は医療への応用の可能性のあるECGFを、生産性や安全性が優れた方法で得ることにより、上述の問題点を解決しようとするものである。

本発明者らは、この目的に沿って鋭意研究の結果、本発明を完成した。

#### [問題点を解決するための手段]

本発明は、a)非還元条件下の分子量は38,000~48,000、b)還元処理により失活する、c)等電点は8.5~9.0という性状を有する新規なECGFに関するものである。本ECGFの生産に用いる細胞としては、本ECGFタンパク

れより本ECGFを分離することができる。精製に用いられるクロマトグラフィーは、本ECGFが親和性を持つものであればいずれも使用できる。たとえば、ヘパリンを結合させたカラムや疎水基をリガンドとして有するカラム、リン酸カルシウムや二酸化ケイ素を素材とするカラム、イオン交換カラム、分子ふるい能をもつカラムによるクロマトグラフィーである。また、SDSポリアクリルアミド電気泳動や等電点電気泳動によりさらに精製することも可能である。このようにして得られた本発明のECGFは、非還元条件下で38,000~48,000の分子量をもち、還元処理により失活し、等電点が8.5~9.0である塩基性タンパク質である。

本発明のECGFの活性判定は公知の活性測定法により行うことができる。すなわち、ニワトリ胎児のChorioallantoic membrane (CAM)を利用する方法[TaylorとFolkman, Nature, 297, 307(1982)およびFolkmanら, Science, 221, 719(1983)]、あるいは、ラット又はウサギのcorn

eal micropocket法 [Gimbrone ら, J. Matl. Cancer Inst., 52, 413(1974) および Fournier ら, Invest. Ophthalmol. Visual Sci., 21, 351(1981)]、また、sustained-release polymer implantsを利用する方法 [Ranger と Folkman, Science, 263, 797(1976) および Murray ら, In Vitro, 19, 743(1983)] などが挙げられる。簡便かつ迅速に行うには、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUV-EC) に対する増殖促進活性を、24ウェル・プラスチックディッシュに植え込んだHUV-ECの増殖量を指標として測定する、KanとYananeの方法 [J. Cell. Physiol., 111, 155(1982)] が望ましい。

本発明のECGFは、直接的には、創傷、火傷、術後組織などの治癒促進剤および心血管障害の治療剤として有用である。また、人工血管の内皮形成剤として用いることもできる。間接的には、この因子の共存により血管内皮細胞の長期培養が可能となり、血管内皮細胞研究に必須の試薬として用いることができる。また、本ECGFの抗体お

よび阻害剤は、悪性腫瘍、網膜症、慢性閉塞性肺疾患の治療剤あるいは診断薬として有用である。

本発明のECGFは、タンパク質製剤としてそのまま粉末として、また薬理学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤とともに医薬組成物（例、注射薬、錠剤、カプセル剤、液剤、軟膏）として、ヒトなどの温血動物に対して経口的あるいは経口的に安全に投与することができる。

このように、本ECGFは、これまで有効な薬剤が少なかった当該分野に、新規で有用な薬剤として提供することができる。

#### [実施例]

次に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例1

ヒト二倍体線維芽細胞を5%牛胎児血清を含むイーグルMEM培地で十分に増殖させ、コンフルエントに達した後、血清を含まないイーグルMEM培地で2~3日、37℃で培養し、その上清を

集めた。この培養上清を50倍に濃縮し、容量効果曲線を描いてみると、第1図に示すように、明らかに濃度に依存したECGF活性が認められた。この培養上清20μlをpH4.5に調整し、40ml (1.6×20cm) のヘパリン・セファロースCL-6B (Pharmacia社) に流した。培養上清中のECGF活性成分はこのカラムに吸着され、1M塩化ナトリウムを含む20mM酢酸緩衝液 (pH4.5) によりカラムから溶出された。この活性画分を、TSKgel Ether-5PW (2.15×15cm, 東洋醸造) に1.5M硫酸存在下で吸着させた。硫酸濃度を徐々に下げて行くと、ECGF活性は1.2~0.5M硫酸で溶出された。さらにこの活性画分をC18-逆相カラム (6×250mm, センシユー科学) に吸着させ、0.1%トリフルオロ酢酸 (pH2.0) 存在下で0~70%アセトニトリル濃度勾配によりECGF活性成分を溶出した。このECGF精製画分を還元剤を含まないSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、ゲルから活性を抽出して分子

量を測定すると、第2図に示したように、分子量38,000~48,000に活性が検出された。このとき、還元剤存在下ではECGF活性は検出できなかった。また、上述のECGF精製画分をポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動にかけ、同様に活性を抽出すると、第3図に示したようにpI8.5~9.0にECGF活性のピークが認められた。上記のECGF活性はいずれもKanとYananeの方法により測定した。

以上の結果から、ヒト二倍体線維芽細胞に産生されたECGFは、a)非還元条件下の分子量は38,000~48,000、b)還元条件下では失活する、c)等電点は8.5~9.0という性状をもつタンパク質であることが分った。

#### [発明の効果]

本発明のECGFは、火傷や創傷などの治癒促進剤および心血管障害の治療剤として有用である。また、悪性腫瘍、網膜症、慢性リウマチ等の治療薬および診断薬として、極めて有用な材料となり得る。さらに本発明のECGFは、従来のものに

比生産性や安全性が非常に優れている方法で得ることができる。

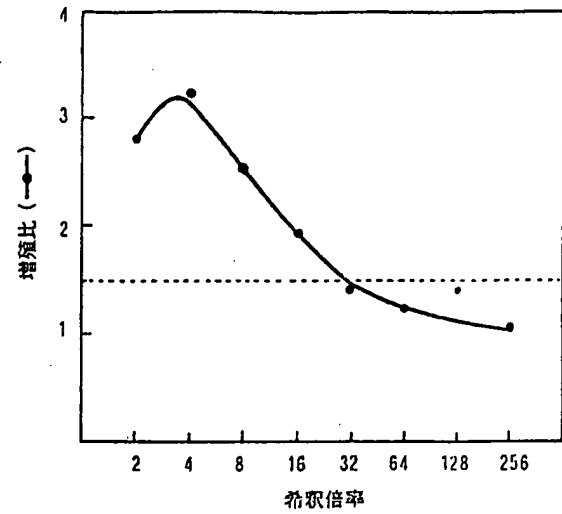
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、ECGF活性の濃度依存性を示す。

第2図は、ECGF活性成分のSDSホリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量測定結果を示す。

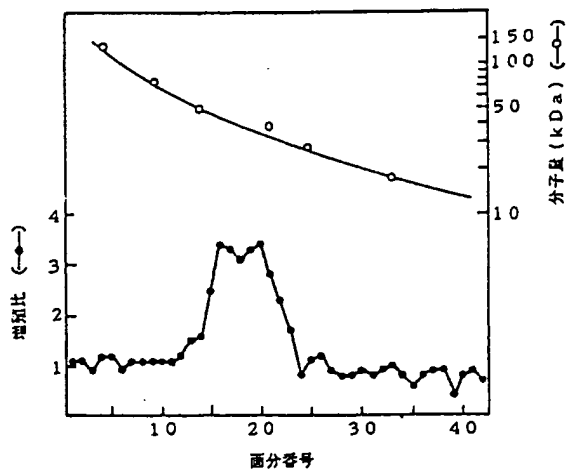
第3図は、ECGF活性成分の等電点測定結果を示す。

特許出願人 東レ株式会社



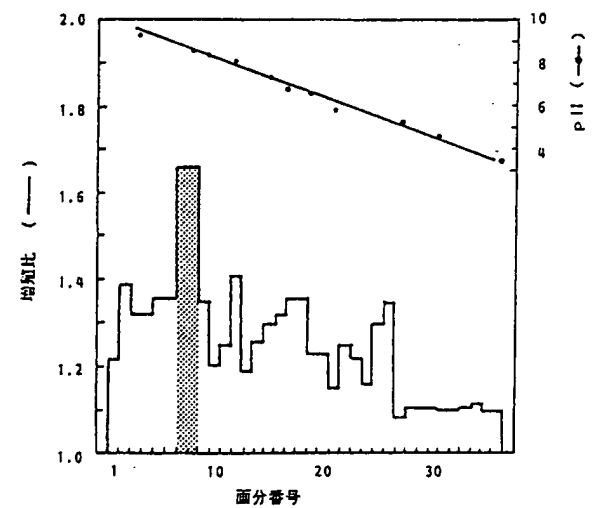
ECGF活性の濃度依存性

第1図



ECGF活性成分のSDS-PAGEによる分子量測定

第2図



ECGF活性成分の等電点測定

第3図